

Japanese Kokai Patent Application No. Hei 9[1997]-206092

**RECEIVED**

**MAY 11 2001**

---

Job No.: 1616-82679

Ref.: 43925/225517

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

JAPANESE PATENT OFFICE  
PATENT JOURNAL (A)  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 9[1997]-206092

Int. Cl.<sup>6</sup>:

C12P 21/00  
A61K 49/00  
C07K 1/18  
1/30  
14/35  
//(C 12 P 21/00  
C 12 R 12/32)

Filing No.:

Hei 8[1996]-34209

Filing Date:

January 30, 1996

Publication Date:

August 12, 1997

No. of Claims:

8 (Total 9 pages; FD)

Examination Request:

Not filed

METHOD FOR ISOLATING PROTEINS FROM BCG SHORT-TERM CULTURE  
SOLUTION WASTES AND REAGENTS FOR MEASUREMENT OF DELAYED TYPE  
HYPERSENSITIVITY REACTION

Inventors:

Katsuhide Kawajiri  
4-17-7-408 Sano  
Otaku, Tokyo

Ikuro Honda  
3-17-7 Minami  
Tamu, Tokyo

Reiko Nakamura  
2-25-3 Chucho  
Musashino, Tokyo

Ichiro Toida  
660-52 Mizuno  
Sayama, Saitama

Shinji Haga  
3-8-40 Kajigatani  
Takatsuku, Kawasaki  
Kanagawa

Sadamu Nagai  
4-5-54 Uenonishi  
Toyonaka, Osaka

Applicant: 593192069  
Nippon BCG Seizo Co., Ltd.  
4-2-6 Kohinata  
Bunkyo, Tokyo

Agent: Masakuni Yamada, patent attorney

[There are no amendments to this patent.]

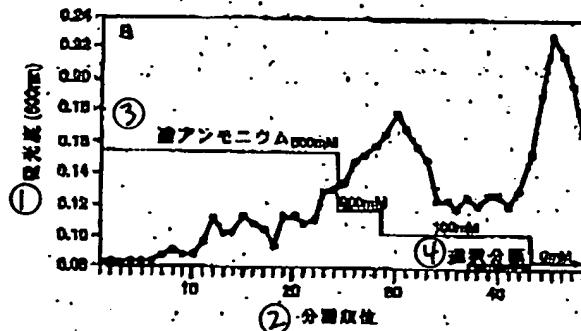
### Abstract

#### Task

Noting that BCG short culture solution wastes are discarded in large amounts as industrial wastes, a method is provided for effective recovery of useful protein discharged by BCG into the culture solution and also recovered protein is provided as a reagent.

#### Means for solution

The spent culture solution described above is heated to 40-45°C, and [separated by] filtration from BCG and low-molecular-weight culture solution components to obtain a protein concentrate. Next, an affinity purification is carried out by a phenylcepharose CL-4B column, followed by purification by a DEAE-Sepharose column using urea, further purification by a Sephacryl S200HR column, and final purification by a DEAE-Sepharose CL-6B column without using urea to obtain desired protein which is used as a reagent.



Key:

- 1 Absorbance
- 2 Fractionation position
- 3 Ammonium sulfate
- 4 Selected fractions

### Claims

1. Method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized in that, in the method for purification of desired protein from a BCG short term culture solution waste using columns of different properties, by packing the starting material, eluting with a buffer solution with fractionation into many fractions, selecting fractions containing proteins to be isolated, concentrating the selected fractions, dialyzing the concentrate, and repeating column purification at least two times by using different columns and buffer solutions containing different components, wherein as a pretreatment for the column purification, the waste culture solution is heated to 40-45°C, freed from residual BCG Tokyo by using filter paper, freed from proteins of molecular weight 5000 or less and culture solution components by filtration and concentrated; the concentrate is treated with ammonium sulfate (hereafter referred to AS) at 60% saturation for precipitation of all proteins, followed by centrifugal separation of the total protein and using the separated total protein for next process step.

2. Method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized in that, in the column purification method for the second step of the above column purification method, the column used is a DEAE Sephadex CL-6B column and a buffer solution is equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris buffer solution (pH 7.5) containing 3M (mol) urea; the pretreated protein for the column purification method is fed; a buffer solution obtained by adding 0-200 mM NaCl to the buffer solution described above is fed with NaCl concentration increasing continuously at an elution rate of 0.5 mL/min with fractionation into many fractions; fractions containing target protein are selected, concentrated and dialyzed during which urea is separated.

3. Method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized by employing the following 5 steps:

a. First step (pretreatment process)

A BCG short term culture waste is heated to 40-45°C, freed from residual BCG Tokyo using filter paper, freed from protein of molecular weight 5000 or less and culture components by filtration, concentrated to 1/200 to 1/350 [volume], treated with AS at 60% saturation for precipitation of total protein, which is then separated using a centrifuge and used for the next process.

b. Column purification process

Second step

The protein from the first step is packed in a phenyl Sepharose CL-4B column (diameter 25 mm, volume 80 mL) and eluted with a 10 mM Tris hydrochloride (HCl) buffer solution containing AS with the AS concentration decreasing from 500 mM to zero stepwise or continuously with a total volume of 450-600 mL with the eluent fractionated into 10 mL fractions; 10  $\mu$ L are sampled from each fraction, mixed with 50  $\mu$ L of BioRad protein assay reagent, and measured for absorbance to obtain an elution pattern; fractions containing proteins with a desired molecular weight are selected, concentrated and dialyzed.

Third step

Using a DEAE Sepharose CL-6B column (diameter 15 mm, volume 75 mL) equilibrated with 3M urea, concentrate from the second step is eluted at an elution rate of 0.5 mL/min using a buffer solution obtained by adding 0-200 mM NaCl to a 30 mM Tris-HCl buffer solution with the NaCl concentration increasing continuously and the eluent is fractionated; next, an elution pattern is obtained by measuring the absorbance similarly as in the second step; fractions containing desired protein are selected, concentrated and dialyzed to obtain a concentrated protein solution.

Fourth step

Using a Sephadryl S200HR column equilibrated with 500 mL of a 10 mM Tris-HCl buffer solution containing 10% ethylene glycol (EG) and 0.3 M NaCl, the concentrated protein solution obtained from the above step is eluted with the same buffer solution used for equilibration with fractionation; an elution pattern is obtained by measuring the absorbance similarly as in the third step; fractions containing desired protein are selected, concentrated and dialyzed to obtain a concentrated protein solution.

### Fifth step

Using a urea-free DEAE Sepharose CL-6B column equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7), the concentrated protein solution obtained in the fourth step is eluted with 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7) with NaCl concentration continuously increasing from 50 mM to 100 mM; the eluent is fractionated; fractions are selected similarly as above, concentrated and dialyzed to obtain desired protein.

4. Method for isolating protein from BCG culture solution waste according to Claim 3, characterized by the above desired protein being PB64.

5. Method for isolating protein from BCG culture solution waste according to Claim 3, characterized by isolating protein from BCG culture solution waste characterized by the desired protein being PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 and two or more of the proteins being isolated together in the same time band in the above second to fifth steps.

6. Delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being one of PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated in Claim 4, as is or freeze dried.

7. Paste type delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being obtained by mixing one of PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated in Claim 4 with a paste.

8. Delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being a patch test adhesive tape impregnated with a mixture of 1 mL of glycerin with a mixture of 15 mg of one of PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated in Claim 4, 2 mL of phosphate buffer solution, 1 g of hydrophilic paste, and 0.04 g of tragacanth gum powder.

### Detailed explanation of the invention

[0001]

#### Technical field of the invention

The present invention concerns a method for isolating useful proteins from proteins discharged by BCG from BCG short term culture and reagents based mainly on the proteins isolated by such method.

[0002]

#### Prior art

Nagai et al. reported on a method for isolating MPB64 and MPB70 from a small amount of culture from a long term incubation of 5-10 weeks of BCG and a method using DEAE Sephadex A-50 and DEAE Sepharose was published in American Society for Microbiology,

Vol. 52, No. 1, pp. 299-302. A method for the manufacture of MPB64 protein by genetic engineering was disclosed in Japanese Kokai Patent Application No. Hei 1[1989]-247094.

[0003]

However, in the former, the starting material is a long term culture, and the quantity is small, and in the latter, process is very complex, because the MPB64 gene is used with a host, and the host produces the MPB64 after cultivation.

[0004]

Problems to be solved by the invention

The present invention concerns a method for isolating useful proteins represented by MPB64, MPB70, etc., from 300 different proteins discharged by BCG during cultivation and to provide a method for efficient isolation of large amounts of such proteins for the market and also to provide delayed type hypersensitivity measurement reagents mainly based on such isolated proteins to the market.

[0005]

Means to solve the problems

For accomplishing such tasks, the present invention concerns a method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized in that, in a method for purification of desired protein from a BCG short term culture solution waste using columns of different properties, by packing the starting material, eluting with a buffer solution with fractionation into many fractions, selecting fractions containing proteins to be isolated, concentrating the selected fractions, dialyzing the concentrate, repeating column purification at least two times by using different columns and buffer solutions containing different components, wherein as a pretreatment for column purification, the waste culture solution is heated to 40-45°C, freed from residual BCG Tokyo using filter paper, freed from proteins of molecular weight 5000 or less and culture solution components by filtration and concentrated, the concentrate is treated with ammonium sulfate (hereafter referred to AS) at 60% saturation for precipitation of all proteins, followed by centrifugal separation of the total protein and use of the separated total protein for next process step.

[0006]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized in that, in the column purification method for the second step of the above column purification method, the column

used is a DEAE Sephadex CL-6B column, the buffer solution is equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris buffer solution (pH 7.5) containing 3M (mol) urea; the pretreated protein for the column purification method is fed; a buffer solution obtained by adding 0-200 mM NaCl to the buffer solution described above is fed with NaCl concentration increasing continuously at an elution rate of 0.5 mL/min with fractionation into many fractions; fractions containing target protein are selected, concentrated and dialyzed during which urea is separated.

[0007]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a method for isolating protein from BCG short term culture solution waste, characterized by employing the following 5 steps:

a. First step (pretreatment process)

BCG short term culture waste is heated to 40-45°C, freed from residual BCG Tokyo using filter paper, freed from protein of molecular weight 5000 or less and culture components by filtration, concentrated to 1/200 to 1/350 [volume], treated with AS at 60% saturation for precipitation of total protein, which is then separated by centrifuging and used for next process.

b. Column purification process

[0008]

Second step

The protein from the first step is packed in a phenyl Sepharose CL-4B column (diameter 25 mm, volume 80 mL) and eluted with a 10 mM Tris hydrochloride (HCl) buffer solution containing AS with the AS concentration decreasing from 500 mM to zero stepwise or continuously with a total volume of 450-600 mL with the eluent fractionated into 10 mL fractions; 10 µL are sampled from each fraction, mixed with 50 µL of BioRad protein assay reagent, measured for absorbance to obtain a elution pattern; fractions containing proteins with a desired molecular weight are selected, concentrated and dialyzed.

[0009]

Third step

Using a DEAE Sepharose CL-6B column (diameter 15 mm, volume 75 mL) equilibrated with 3M urea, the concentrate from the second step is eluted at an elution rate of 0.5 mL/min using a buffer solution obtained by adding 0-200 mM NaCl to a 30 mM Tris-HCl buffer solution with the NaCl concentration increasing continuously and the eluent is fractionated; next, an

elution pattern is obtained by measuring the absorbance similarly as in the second step; fractions containing desired protein are selected, concentrated and dialyzed to obtain a concentrated protein solution.

[0010]

**Fourth step**

Using a Sephadex S200HR column equilibrated with 500 mL of a 10 mM Tris-HCl buffer solution containing 10% ethylene glycol (EG) and 0.3 mM NaCl, the concentrated protein solution obtained from the above step is eluted with the same buffer solution used for equilibration with fractionation; an elution pattern is obtained by measuring the absorbance similarly as in the third step; fractions containing desired protein are selected, concentrated and dialyzed to obtain a concentrated protein solution.

[0011]

**Fifth step**

Using a urea-free DEAE Sepharose CL-6B column equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7), the concentrated protein solution obtained in the fourth step is eluted with 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7) with the NaCl concentration continuously increasing from 50 mM to 100 mM; the eluent is fractionated; fractions are selected similarly as above, concentrated and dialyzed to obtain desired protein.

[0012]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a method for isolating protein from BCG short term culture solution waste involving the above first to fifth steps, characterized by the above desired protein being PB64.

[0013]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a method for isolating protein from BCG short term culture solution waste involving the above first to fifth steps, characterized by the desired protein being PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 and two or more of the proteins being isolated together at the same time band in the above second to fifth steps.

[0014]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being one of the PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated, as is or freeze dried.

[0015]

For accomplishing such tasks, the present invention also concerns a paste type delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being obtained by mixing one of the PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated with a paste.

[0016]

#### Operation of the invention

In Claim 1 of the present invention, BCG short term culture waste solution from making BCG preparations is used as the starting material. Before isolating desired proteins from many proteins discharged by the BCG, the waste culture solution is heated to 40-45°C for reduced viscosity of the culture solution and good flow through a filter for removing residual BCG and then proteins with a molecular weight smaller than desired and culture solution components are quickly filtered out.

[0017]

In Claim 2 of the present invention, in addition to the action of Claim 1, in a second column purification as part of a column purification method in a second step of the above column purification method, the column used is a DEAE Sephadex CL-6B column, the buffer solution is equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris buffer solution (pH 7.5) containing 3M (mol) urea; the pretreated protein for the column purification method is fed; a buffer solution obtained by adding 0-200 mM NaCl to the buffer solution described above is fed with the NaCl concentration increasing continuously, during which impurities bonded to or incorporated into the protein are bonded with urea and removed. Immediately after this step, the eluent is dialyzed to remove the urea from the eluent, and thus denaturation or activity lowering of the isolated proteins will not occur.

[0018]

In Claim 3 of the present invention, in addition to the actions of the present invention of Claims 1 and 2, by steps of 1 to 5, from the BCG short term culture waste, at least one of desired proteins is isolated with high purity. Especially, in the second step, when two or more proteins are to be isolated, a plurality of fractions are independently selected, and in the subsequent step,

each fraction can be purified individually. In Claim 4 of the present invention, in addition to the action of Claim 3, MPB64 is isolated at high purity as the desired protein.

[0019]

In Claim 5 of the present invention, in addition to the action of Claim 3, in the second step, at least two of MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 are independently fractionated at the same time and then the fractionated proteins can be isolated at high purity individually at the same time.

[0020]

Claim 6 of the present invention concerns a delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being one of PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated in Claim 4, as is or freeze dried, showing a unique reaction to antibodies.

[0021]

Claim 7 of the present invention concerns a paste type delayed type hypersensitivity measurement reagent characterized by being obtained by mixing one of PB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 isolated in Claim 4 with a paste. When a portion of this is coated on the skin of an animal such as a human, cow, etc., adhesion to the skin lasts for a long time, and depending on the presence or absence of antibodies against certain proteins of humans or animals, inflammation to hardening in the skin will or will not result.

[0022]

In Claim 8 of the present invention, the product can be attached to the skin with a skin reaction similar to Claim 7.

[0023]

Practical embodiments of the invention

Materials and method

Culture

Sauton synthetic culture

Strain used: *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo used in the manufacture of Nippon BCG Vaccine. The BCG strain is transplanted in the Sauton medium and subjected to surface culture at 37°C with air circulation. On the 8<sup>th</sup> day, the cells are filtered out for vaccine preparation, and residual culture is collected and used as starting material.

Column: DEAE Sepharose CL-6B, Sephacryl S200HR, Sepharose CL-4B (products of Uppsala Pharmacia LKB, Sweden).

[0024]

Sample concentration

Millipore Pellicon System XX42PEL60 (product of Millipore Co., Bedford, MA, USA) and Amicon YM-3 membrane (product of Amicon, Inc., MA, USA) were used.

[0025]

Two-dimensional electrophoresis (hereafter referred to as 2D-E)

A Milliporeinvestigator 2-D electrophoresis system was used for 2 D-E. For one dimension, isoelectric point electrophoresis was carried out at pH 3-10 and 18000 V/hr using 9.5 M urea containing 5.5% base-acid ampholite mixture. For two dimension, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrolysis (hereafter referred to as SDS-PAGE) was carried out at 16000 mW using 12.5% polyacrylamide gel.

[0026]

Reagents

Those for the 2-D electrophoresis system of Millipore Co. were used. The gel was dyed with a silver staining reagent (product of Daiichi Kagaku Yakuin Co., Tokyo, Japan). The molecular weight was measured by using standard protein (product of BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA). All other reagents are products of Wako Junyaku Co.

[0027]

#### Practical Embodiment 1

Next, the present invention is explained with practical embodiments including Claims 1-5.

First step (pretreatment)

First, 80-100 L of culture waste as the starting material was heated to 40-45°C, filtered through No. 2 filter paper to remove BCG cells remaining in the starting material, and while maintained at 40-45°C, fed to a Millipore Pellicon Cassette. The two filters of this Millipore Pellicon Cassette PLCC00005 are used for molecules with a molecular weight of 5000 or less such as glycerin and other culture components. As a result, the initial starting material was concentrated to 300-400 mL. To save time, the concentrating may be done in several sections using Millipore Pellicon Cassette PLCC00005.

[0028]

As described above, the culture waste as the starting material was heated to lower the viscosity and to facilitate the passage of molecules with a molecular weight of 5000 or less through the filter in a short time, and the concentrate was filtered again through a Millipore Membrane Millipack 60 (0.22  $\mu$ m, product of Millipore Co.) for complete removal of BCG cells.

[0029]

The concentrated culture filtrate was treated with ammonium sulfate at 60% saturation for precipitation of all proteins. The precipitation mixture was left as is or stored in a refrigerator and centrifuged at 6000 rpm and the supernatant removed. The 2D-E (two-dimensional electrophoresis) of the concentrate is shown in Figure 1. The proteins secreted by the BCG cells are scattered as independent spots according to the isoelectric point and molecular weight. For example, MPB64 (26 kDa) is indicated by an arrow.

[0030]

Second step (Affinity (affin) purification of proteins by phenyl Sepharose)

The total protein from step 1 was packed in a phenyl Sepharose CL-4B column and eluted at room temperature with 10 mM Tris-HCl buffer solution containing ammonium sulfate (AS) from a concentration of 500 mM to zero, i.e., 500 mM AS: 150 mL, 200 mM AS: 50 mL, 100 mM AS: 150 mL, then zero AS: 120 mL.

[0031]

The eluent was fractionated into 10 mL fractions, and 10  $\mu$ L was sampled from each fraction, mixed with 50  $\mu$ L of 5-fold diluted BioRad reagent (Protein Assay BioRad) and measured for 600 nm absorbance with a microplate reader. An example of an elution pattern is shown in Figure 2. In Figure 2, e.g., the MPB64 peak appears after the maximum protein peak including MPBs, which has been published. In the case of purification of MPB64, fractions containing MPB64 are found as MPB64 is detected by molecular weight using the elution pattern and SDS-PAGE, and the right fractions are selected. In the second step, when the desired protein is in more than one fraction, multiple fractions are selected.

[0032]

In a specific method of SDS-PAGE, using a 10-20% polyacrylamide multigel kit (product of Daiichi Seiyaku Co., Tokyo, Japan) as the gradient gel, at 40 mA, protein was stained by silver stain reagent together with standard proteins such as MPB64 and MPB70, and

fractions containing protein corresponding to the standard protein were selected. Fractions containing desired protein such as MPB64 were concentrated through an Amicon YS-3 membrane.

[0033]

The concentrate was placed into a Slide A Riser Cassette (product of Pierce Co., Rockford, Ill, USA) and dialyzed using 10 mM Tris-HCl of pH 7.5 at 4°C for 1 day. The dialyzed product was passed through a Millipore Milex GV filter (0.22  $\mu$ m), and the protein content was determined by the Lawry method.

[0034]

Third step (purification by DEAE Sepharose column containing urea)

A DEAE Sepharose CL-6B column (diameter 15 mm, volume 75 mL) was equilibrated with 500 mL of 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.5) containing 3M urea. The concentrate from the second step was fed to the DEAE Sepharose CL-6B column and eluted with the buffer solution used for the equilibration with a concentration gradient of NaCl (0-200 mM).

[0035]

The eluent obtained at an eluting speed of 0.5 mL/min at 4°C was fractionated into 46-100 fractions of 5 mL each, and each fraction was measured for absorbance at 600 nm using BioRad reagent as in the second step. Results are shown in Figure 4. For the fractionation samples, the desired protein, e.g., MPB64 was detected by the SDS-PAGE similarly as in the second step. Fractions were selected accordingly, concentrated, dialyzed and filtered similarly as in the second step to obtain desired concentrate. In the above dialysis step, the urea component added in the elution is removed. The protein content was determined similarly as in the third [sic] step.

[0036]

Fourth step (purification by Sephadryl column)

A Sephadryl S200HR column (diameter 25 mm, volume 450 mL) was equilibrated with 500 mL of 10 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.5) containing 10% ethylene glycol and 0.3 M NaCl at low temperature. The concentrate obtained in the third step was fed to the Sephadryl S200HR column and eluted with the same buffer solution used in the equilibration at a rate of 0.5 mL/min and fractionated into 46-100 fractions of 5 mL each. Each fraction sample was mixed with BCA protein assay reagent (product of Pierce Co., Rockford, Ill, USA) instead of the

BioRad reagent of the second step and measured for absorbance at 562 nm by SDS-PAGE to detect the desired protein, and the corresponding fractions were selected (see Figure 4).

[0037]

After gel staining by CBB, gel staining with more sensitive silver staining is preferred. The fractions containing the desired protein were combined, concentrated by an Amicon YM-3 membrane and dialyzed in 10 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7) at 4 °C for 1 day, followed by filtering through a 0.45 µm Millipore filter. The protein content was determined by the Lawry method.

[0038]

Fifth step (purification by urea-free DEAE Sepharose column)

In this final step of purification, the protein recovered in the fourth step was fed to a DEAE Sepharose CL-6B column equilibrated with urea-free 30 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7) containing 50 mM NaCl and eluted with 500 mL of 30 mM Tris-HCl buffer solution containing NaCl with a concentration gradient of 50-100 mM at 4°C at a rate of 0.5 mL/min with fractionation into 64-100 fractions of 5 mL each (see Figure 5).

[0039]

The desired protein detection was done by absorbance at 600 nm and SDS-PAGE as in the third step. Similar to the previous step, desired protein containing fractions were combined, concentrated, dialyzed in 10 mM Tris-HCl buffer solution (pH 8.7) and filtered through a Millipore Milex GV filter (0.22 µm, product of Millipore Co.) The final protein content was measured by the Lawry method.

[0040]

In this practical embodiment, a description is given mainly for isolation of MPB64 and MPB70, while methods for simultaneous isolation of other useful proteins are also included in Claims 1-5 of the present invention. Clearly, for isolation of many proteins, the proteins are isolated individually in the second step in parallel. Then, the proteins are purified in parallel at the same time.

[0041]

In the above third and fifth steps, the description is based on cases wherein the buffer solutions used for elution contain additives with a concentration gradient, and this embodiment also involves methods providing additives in 4-10 steps of sequential concentration.

[0042]

Practical Embodiment 2

This embodiment is for the invention described in Claim 6; one of the purified proteins MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 obtained in Practical Embodiment 1 is sealed with an inert gas in a bottle or ampule to obtain a product.

[0043]

Practical Embodiment 3

This embodiment is for the invention described in Claim 7; 15 mg of one of purified proteins MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 obtained in Practical Embodiment 1 was dissolved in 2 mL of a phosphate buffer solution, mixed with 0.5-1.5 g of hydrophilic paste and a small amount of tragacanth gum powder (0.02-0.05 g) and sealed in a flat container of inner diameter 8-11 mm. The components, weights and volumes are for example only and the invention is not limited to them.

[0044]

Practical Embodiment 4

This embodiment is for the invention described in Claim 8; one of purified proteins MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 obtained in Practical Embodiment 1 was dissolved in 2 mL of a phosphate buffer solution, mixed with 1 mL of glycerin and/or 10% polyethylene glycol, 5-20  $\mu$ L of antigen from the above-mentioned protein was impregnated into a patch test adhesive tape which is to be attached to skin for allergic reaction testing or into a filter paper in an aluminum dish, so-called Finn chamber for applying the antigen impregnated filter paper on skin and sealed in a plastic container or airtight bag.

[0045]

Effect of the invention

In the invention described in Claim 1, BCG culture waste is utilized, i.e., effective utilization of industrial waste is achieved. The culture waste is heated to 40-45°C for reduced viscosity for easy passage through filter paper, resulting in reduced processing time, with removal of highly viscous glycerin from the culture waste for ease of handling in subsequent processes. Heating at such a level does not affect the potency of the protein.

[0046]

In the invention described in Claim 2, a DEAE Sepharose CL-6B column is used after equilibration with 30 mM Tris buffer solution (pH 7.5) containing 3 M (mol) urea. The same urea-containing buffer solution is fed to the column with NaCl content increasing gradually from 0 to 200 mM to elute the desired protein with removal of impurities bonded to or surrounding the protein. During elution, the eluted solution remains neutral, and by immediate dialysis or filtration, the urea is removed from the purified protein. Irreversible denaturation of the protein by urea is minimized.

[0047]

In the invention described in Claim 3, in addition to the effects of the present invention described in Claims 1 and 2, by employing a second step method, useful proteins can be fractionated into one or more proteins. Furthermore, by the methods of a third step and thereafter, the purity of each protein is enhanced. Each protein isolated is compared with standard protein for identification. The purity of protein isolated is comparable to that of the standard.

[0048]

Also, although not illustrated above, other mycobacteria antigens including common antigens of tuberculin and mycobacteria can also be purified.

[0049]

In the invention described in Claim 4, in addition to the effects of Claims 1-3, the protein isolated is MPB64, and isolated MPB64 in combination with MPB70 can differentiate tuberculosis infection and BCG positive.

[0050]

In the invention described in Claim 5, in addition to the effects of Claims 1-4, two or more of proteins MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 can be isolated in parallel at the same time by methods of step 2 through step 5; thus, starting from a single starting material, two or more proteins can be isolated effectively.

[0051]

In the invention described in Claim 6, each of MPB59, MPB64, MPB70, MPB80 and MPB85 is sealed in, and by diluting with a diluent similarly as with conventional tuberculin reaction reagents, each can be used for coating the skin or injection in humans and animals. Also,

by mixing with suitable hydrophilic paste, glycerin, polyethylene glycol, etc., each can easily be used as a paste for coating the skin as a reaction reagent. In the invention described in Claim 7, in addition to the effects of Claim 6, the paste is easy to handle and easily adheres to the skin for a long time. In the invention described in Claim 8, in addition to the effects of Claim 8 [sic], the product is an adhesive tape, thus it can be adhered to the skin directly.

[0052]

Experimental Example 1

Using 100 L of the culture immediately after BCG cultivation for 8 days by the method of Practical Embodiment 1, in the final fifth step in the case of isolating MPB64, 5 mg of MPB64 was obtained. The thus obtained MPB64 and MPB70 were processed by SDS-PAGE and tested by an immunoplotting method using anti-MPB64 and anti-MPB70 antibodies showed a reaction similar to standard MPB64 and MPB70.

[0053]

Experiment Example 2

PMB64 and MPB70 were isolated by Practical Embodiment 1, combined together, and tested using a tuberculosis germ infected guinea pig and a BCG inoculated guinea pig. The guinea pig with tuberculin positive by BCG inoculation showed a positive reaction to MPB64 and MPB70. The tuberculosis germ infected one was positive to PMB64, but negative to MPB70. Thus, tuberculosis infection and BCG positive can be easily differentiated.

[0054]

Experimental Example 3

MPB59 has a similar effect as a tuberculin reaction, and MPB80 and MPB85 can be used for allergy tests. These tests can be used effectively for tuberculosis infection of humans and cattle.

Brief description of the figures

Figure 1 shows isoelectric points and molecular weight profiles of various proteins by 2D-E (two-dimensional electrophoresis).

Figure 2 is a graph illustrating absorbance profiles by protein for each fraction in second step collected fractions as determined by SDS-PAGE.

Figure 3 is a graph illustrating absorbance profiles by protein for each fraction in third step collected fractions as determined by SDS-PAGE.

Figure 4 is a graph illustrating absorbance profiles by protein for each fraction in fourth step collected fractions as determined by SDS-PAGE.

Figure 5 is a graph illustrating absorbance profiles by protein for each fraction in fifth step collected fractions as determined by SDS-PAGE.

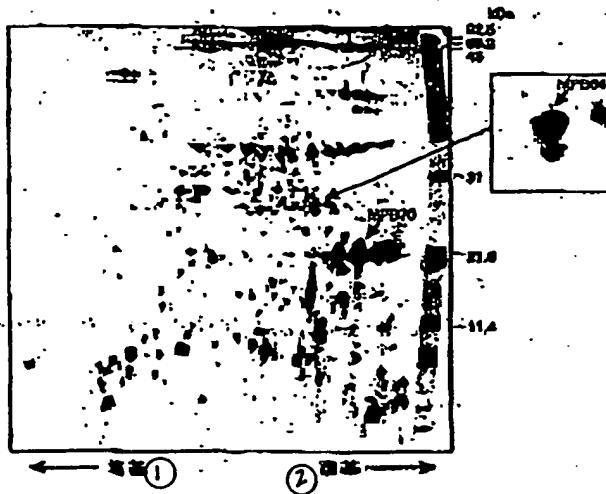


Figure 1

Key: 1 Base  
2 [illegible]

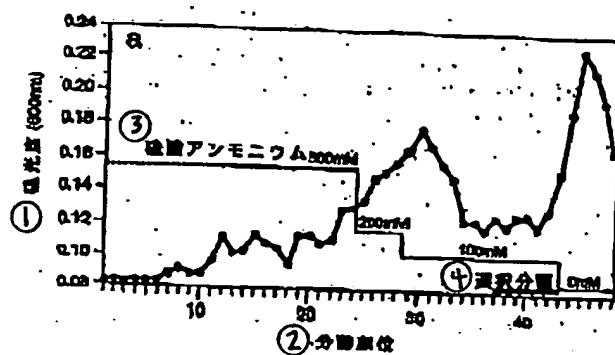


Figure 2

Key: 1 Absorbance  
2 Fractionation position  
3 Ammonium sulfate  
4 Selected fractions

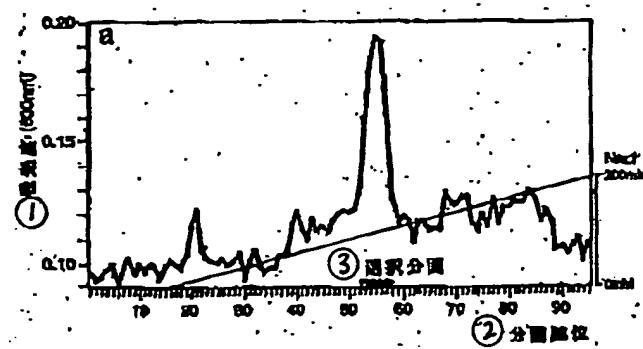


Figure 3

Key: 1 Absorbance  
 2 Fractionation position  
 3 Selected fractions

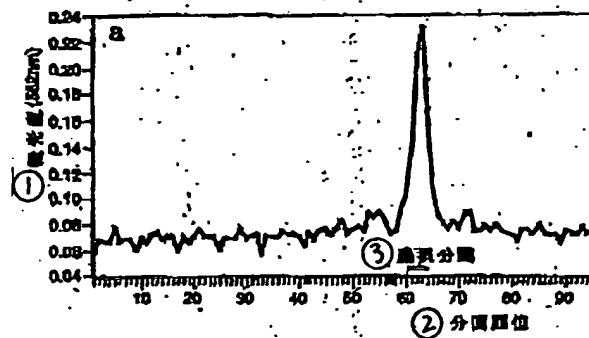


Figure 4

Key: 1 Absorbance  
 2 Fractionation position  
 3 Selected fractions

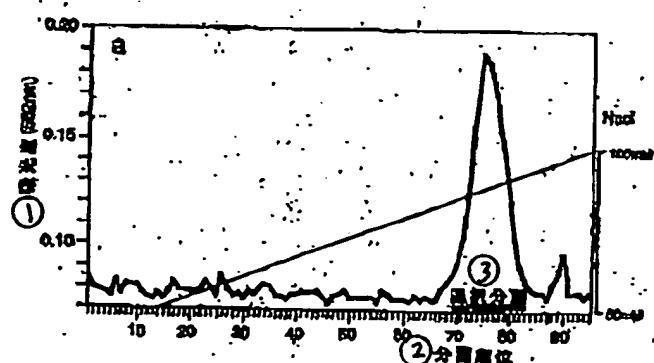


Figure 5

Key: 1 Absorbance  
2 Fractionation position  
3 Selected fractions

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-206092

(13)公開日 平成9年(1997)8月12日

(51)Int.Cl*	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
C12P 21/00			C 12 P 21/00	Z
A 61 K 49/00			A 61 K 49/00	Z
C 07 K 1/18			C 07 K 1/18	
1/30			1/30	
14/35			14/35	

審査請求 未請求 請求項の数 8 FD (全 9 頁) 最終頁に記載

(21)出願番号	特願平8-34208	(71)出願人	593192083 日本ビーシーシー製造株式会社 東京都文京区小日向4-2-6
(22)出願日	平成8年(1996)1月30日	(72)発明者	河尻 亮秀 東京都大田区山王4丁目17番7-403号
		(72)発明者	本田 審郎 東京都田無市南町3丁目17番7号
		(72)発明者	中村 哲子 東京都武藏野市中町2丁目25番3号
		(72)発明者	戸井田 一郎 埼玉県秩父市水野550番52
		(74)代理人	弁理士 山田 正司

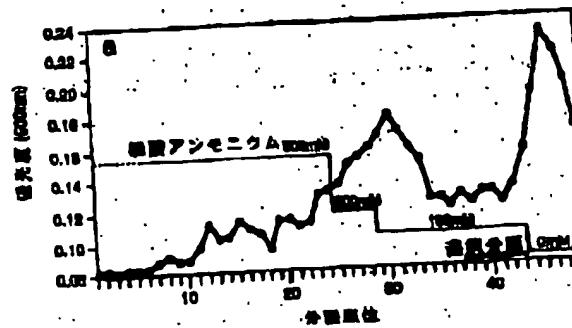
最終頁に記載

(54)【発明の名称】 BCG菌短期培養液の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法及び速速測定法反応測定用試薬

## (57)【要約】

【課題】 BCG菌を短期培養した使用済培養液が大量に産業廃棄物として、產生されることに着目し、これを有出物質として、BCG菌が前記培養液中に排出した有用蛋白質を効率よく回収する方法及びその回収した蛋白質を試薬として提供すること。

【解決手段】 前記使用済培養液を4.0°C乃至4.5°Cに加温して、先ず、BCG菌体と分子量の小さい培養液成分を順次分別し濃縮蛋白質にする。次にフェニルセファロースCL-4Bカラムによるアフィニティ精製を行う。次に尿素使用DEAE-セファロースカラムにより精製する。更にセファクリルS200HRカラムにより精製する。最後に尿素不使用DEAE-セファロースCL-6Bカラムで精製し、目的の蛋白質を得る。またこれを用いた試薬とする。



特開平9-206092

(2)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 BCG菌短期培養後の使用済み培養液を性質のことなるカラムを用い、前記出発物質を装填し、緩衝液により溶出して、順次複数箇に分画し、この中より単離すべき蛋白質を含む分画を選択し、この分画液を濃縮した後透析するカラム精製方法を、異なる性質のカラムを用い異なる成分を含有する緩衝液により前記同様のカラム精製方法を少なくとも2回行い、目的の蛋白質を製する方法において、

前記カラム精製方法の前処理として、前記使用済み培養液を40乃至45°Cに加温し、これを沪紙により、先ず残存BCG東京菌を除去し、次いで分子量約5000以下の蛋白質及び培養液成分を沪別除去し、前記使用済み培養液を濃縮し、

次いで、この濃縮液に硫酸アンモニウム（以下単にAS）を60%飽和に加え、全蛋白質を沈殿させ、遠心分離により前記全蛋白質を分離し、この分離した蛋白質を次工程に供給することを特徴とするBCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法。

【請求項2】 前記カラム精製方法の2番目の段階のカラム精製方法において、カラムとして、DEAEセファロースCL-6Bカラムを使用し、緩衝液として、3M尿素を含む30mMトリス緩衝液（pH7.5）500mlで平衡化して、カラム精製方法の前処理後の蛋白質を供給し、前記と同一の緩衝液にNaClを0乃至200mM加えた緩衝液をNaClの含有濃度を連続的に次第に高めながら濃度の低い方から順に供給し、溶出速度を0.5ml/分として、数区分に分画し、目的蛋白質を含む分画を選択し、

次いで、選択された分画蛋白質を濃縮し、次いで透析する過程において前記尿素を分離する方法であることを特徴とするBCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法。

## 【請求項3】 a. 第1段階（前処理工程）

BCG菌短期培養後の使用済み培養液を40乃至45°Cに加温し、これを沪紙により、先ず残存BCG東京菌を除去し、次いで分子量約5000以下の蛋白質及び培養液成分を沪別除去し、前記使用済み培養液を1/200乃至1/350に濃縮し、次いで、この濃縮液にASを60%飽和に加え、全蛋白質を沈殿させ、遠心分離により蛋白質を分離し、この分離した蛋白質を次工程に供給する。

## b. カラム精製工程

## 第2段階

第1段階による蛋白質をフェニル・セファロースCL-4Bカラム（直徑25mm、容積80ml）に装填し、ASを含む10mMトリス塩酸（HCl）緩衝液を、前記AS濃度を順に500mMのAS含有のものから、全く含まないものまで段階的乃至連続的にAS濃度を低めながら、全量で450乃至600ml供給し、溶出液を

2

順次10mlずつ分画する。各分画より10μlずつサンプリングしたものにバイオーラッドプロテインアッセイ試薬50μlを混合し、吸光度を測定し、溶出パターンを求める。更に電気泳動により、目的の分子量の蛋白質が含まれる分画を選択し、この分画の溶出液を濃縮し、更に透析する。

## 第3段階

前記第2段階で濃縮した液を、3M尿素で平衡化したDEAEセファロースCL-6Bカラム（直徑15mm、容量75ml）を用い、30mMトリス-HCl緩衝液にNaClを0乃至200mM加えた緩衝液をNaClの含有濃度を連続的に高めながら供給し、溶出速度を0.5ml/分として、溶出液を分画する。次いで第2段階と同様に吸光度を測定して溶出パターンを求める。目的の蛋白質を含む分画を選択し、次いで、選択された分画蛋白質を濃縮・透析し、濃縮蛋白質液とする。

## 第4段階

前段階で得られた濃縮蛋白質液を10%エチレングリコール（EG）0.3M及びNaClを含む500mlの10mMのトリス-HCl緩衝液で平衡化したセファクリルS200HRカラムを用い、平衡化に用いたのと同じ緩衝液で溶出し、順次分画する。次いで第3段階と同様に吸光度を測定して溶出パターンを求める。目的の蛋白質を含む分画を選択し、次いで、選択された分画蛋白質を濃縮し、透析し濃縮蛋白質液とする。

## 第5段階

第4段階の濃縮蛋白質液を尿素を含まないDEAEセファロースCL-6Bカラムを30mMトリス-HCl緩衝液（pH8.7）500mlで平衡化したもの用い、30mMトリス-HCl緩衝液（pH8.7）にNaClを50mM乃至100mMまで連続的に濃度を上昇させた溶出液で溶出し、順次分画する。次ぎに前段階と同様の方法により分画を選択し、濃縮及び透析し、目的の蛋白質を得る。以上第1段階乃至第5段階よりなることを特徴とするBCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法。

【請求項4】 前記目的蛋白質はMPB64であることを特徴とする請求項3記載の発明のBCG培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法。

【請求項5】 前記目的蛋白質はMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85であり、これら内、2種以上の蛋白質を前記以上第2段階乃至第5段階において、同時に並行して単離する方法であることを特徴とするBCG培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離することを特徴とする請求項3記載の発明のBCG培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法。

【請求項6】 前記請求項4で単離したMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85のうちの一種をその保乃至凍結乾燥してあることを特徴とす

50

特開平9-206092

(3)

4

3

【発明の種類】  
遅延型過敏反応測定用試薬。

【請求項7】前記請求項4で単離したMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85のうちの一種と軟膏剤とが混合してあることを特徴とする軟膏状の遅延型過敏反応測定用試薬。

【請求項8】請求項4で単離したMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85のうちの一種1.5mgに対し、リン酸緩衝液2mlの割合で溶解し、親水性軟膏剤1g及びトラガカントゴム粉末0.04gの割合で混合したものに更にグリセリン1mlの割合で混合したものがパッチテスト用軟膏に含浸させることを特徴とする遅延型過敏反応測定用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術】この発明はBCG菌短期培養液よりBCG菌が排出した蛋白質より有用な蛋白質を単離する方法及びこの方法により、単離された蛋白質を主剤とする試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、BCG菌を5週間乃至10週間の長期培養した少量の培養液より、MPB64、MPB70を単離する方法は永井らによって、DEAEセファロースを用いて、クスA-50、及びDEAEセファロースを用いて、単離する方法が1986年4月アメリカン・ソサイエティ・オブ・マイクロバイオロジイ発行、インフェクション・アンド・イムニティ(American Society for Microbiology)、Vol.52, No.1 p293~302に発表されている。また遺伝子工学を用い前記のMPB64蛋白質を製造する方法は、特開平1-247094特許公開公報によって知られている。

【0003】然しそれ、前者の方法は出発物質が長期培養の培養液であり、量も極めて少ない。また後者のものは、宿主にMPB64遺伝子を組み込んで、宿主を培養し、宿主よりMPB64を取り出す方法であり、その操作は極めて煩瑣である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】この発明はBCG菌を培養中に前記菌体が菌体外に排出する300種類にも達する蛋白質の中より、MPB64、MPB70などで代表される有用蛋白質を分離するための方法であり、大量のこれら蛋白質を能率よく単離する方法を市場に提供し、併せて、この単離した蛋白質を主剤とする遅延型過敏反応測定用試薬を市場に提供するためである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】前記の課題を達成するため、この方法発明はBCG菌短期培養後の使用済み培養液を性質のことなるカラムを用い、前記出発物質を培養液により溶出して、順次複数箇に分画し、こらし、緩衝液により溶出して、順次複数箇に分画し、この分画より単離すべき蛋白質を含む分画を選択し、この分画液を濃縮した後透析するカラム精製方法を、異なる性質のカラムを用い異なる成分を含有する培養液により前記同様のカラム精製方法を少なくとも2回行い、蛋白質を精製する方法において、前記カラム精製方法の前処理として、前記使用済み培養液を40乃至45℃に加温し、これを汎紙により、先ず残存BCG東京菌を除去し、次いで分子量約5000以下の蛋白質及び培養液成分を汎紙により除し、前記使用済み培養液を濃縮し、次いで、この濃縮液に硫酸アンモニウム(以下単にAS)を60%飽和に加え、全蛋白質を沈殿させ、遠心分離により蛋白質を分離し、この分離した蛋白質を次工程に供給することを特徴とするBCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法とする。

【0006】前記の課題を達成するために、前記BCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法の前記カラム精製方法の二番目の段階のカラム精製方法において、カラムとして、DEAEセファロースCL-6Bカラムを使用し、緩衝液として、3M(モル)尿素を含む30mMトリス緩衝液(pH7.5)500mlで平衡化して、カラム精製方法の前処理後の蛋白質を供給し、前記と同一の緩衝液にNaClを0乃至200mM加えた緩衝液をNaClの含有濃度を連続的に次第に高めながら濃度の低い方から順に供給し、溶出速度を0.5ml/分として、数区分に分画し、目的蛋白質を含む分画を選択し、次いで、選択された分画蛋白質を濃縮し、次いで透析する過程において前記尿素を分離する方法であることを特徴とすることが好ましい。

【0007】また前記の課題を達成するために、この方法発明は、  
a. 第1段階(前処理工程)  
BCG菌短期培養後の使用済み培養液を40乃至45℃に加温し、これを汎紙により、先ず残存BCG東京菌を除去し、次いで分子量約5000以下の蛋白質及び培養液成分を汎紙により除し、前記使用済み培養液を1/200乃至1/350に濃縮し、次いで、この濃縮液にASを60%飽和に加え、全蛋白質を沈殿させ、遠心分離により蛋白質を分離し、この分離した蛋白質を次工程に供給する

b. カラム精製工程  
【0008】第2段階  
第1段階による蛋白質をフェニル・セファロースCL-6Bカラム(直径2.5mm、容積80ml)に詰めし、ASを含む10mMトリス塩酸(HCl)緩衝液を、前記AS濃度を順に500mMのAS含有のものから全く含まないものまで段階的乃至連続的に濃度を低めながら全量で450乃至600mlをAS濃度の高い方から供給し、溶出液を順次10mlずつ分画する。各分画より10μlずつサンプリングした後にバイオーラッドプロテインアッセイ試薬50μlを混合し、吸光度を測定し、溶出パターンを求め、更に電気泳動により、目的の分子量の蛋白質が含まれる分画を選択し、この分画の溶

50

特開平9-206092

(4)

6

5

出液を濃縮し、更に透析する。

【0009】第3段階

前記第2段階で濃縮した液を、3M尿素で平衡化したDEAEセファロースCL-6Bカラム（直徑15mm、容量75ml）を用い、30mMトリス-HCl緩衝液にNaClを0乃至200mM加えた緩衝液をNaClの含有濃度を連続的に高めながら供給し、溶出速度を0.5ml/分として、溶出液を分画する。次いで第2段階と同様に吸光度を測定して溶出パターンを求め、目的の蛋白質を含む分画を選択し、次いで、選択された分画蛋白質を濃縮し、濃縮蛋白質液とする。

【0010】第4段階

前段階で得られた濃縮蛋白質液を10%エチレングリコール(EG)及び0.3MのNaClを含む500mlの10mMのトリス-HCl緩衝液で平衡化したセファクリルS200HRカラムを用い、平衡化に用いたのと同じ緩衝液で溶出し、順次分画する。次いで第3段階と同じ段階で溶出し、順次分画する。次いで第3段階と同じ段階で溶出し、順次分画する。次いで、選択された分画蛋白質を含む分画を選択し、次いで、選択された分画蛋白質を濃縮し、透析し濃縮蛋白質液とする。

【0011】第5段階

第4段階の濃縮蛋白質液を尿素を含まないDEAEセファロースCL-6Bカラムを30mMトリス-HCl緩衝液(pH8.7)500mlで平衡化したもの用い、30mMトリス-HCl緩衝液(pH8.7)にNaClを50mM乃至100mMまで連続的に濃度を上昇させた溶出液で溶出し、順次分画する。次に前段階と同様の方法により分画を選択し、濃縮及び透析し、目的の蛋白質を得る。以上第1段階乃至第5段階よりなることを特徴とするBCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法とする。

【0012】前記の課題を達成するために、前記BCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法の第1段階乃至第5段階の方法において、単離する前記目的蛋白質はMPB64であることを特徴とする場合もある。

【0013】前記の課題を達成するために、前記BCG菌短期培養後の使用済み培養液より蛋白質を単離する方法の第1段階乃至第5段階の方法に於いて、単離する前記目的蛋白質はMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85であり、これら内、少なくとも2種の蛋白質を前記以上第2段階乃至第5段階において、同時に並行して単離する方法であることを特徴とする場合もある。

【0014】前記の課題を達成するために、この物の発明は、前記の単離したMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85のうちの一種をその内、少なくとも2種を第2段階に於いて、それぞれ独立して同時に分離され、その後それぞれの分離された蛋白質に同時に平行して、それぞれ純度を高く単離する作用をなす。

【0015】前記の課題を達成するために、この物の発

明は、前記の単離したMPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85のうちの一種と教育剤とが混鏡してあることを特徴とする軟膏状の透延型過敏反応測定用試薬。

【0016】

【発明の作用】請求項1記載の方法発明に於いては、出発物質として、BCG菌を製造する時に產生されるBCG菌を短期培養した使用済みの培養液を用い、この中に前記BCG菌より、その菌体外に排出された多種類の蛋白質中より目的の蛋白質を単離するに先立ち、この使用済み培養液を40°C乃至45°Cに加温することによって、培養液の粘稠度が低下し、フィルターで済する場合に、流動性がよくなり、先ず残存するBCG菌が除去され、次いで目的の蛋白質の分子量よりも小さい分子量の蛋白質及び培養液成分が短時間で済温される作用がある。

【0017】請求項2記載の方法発明に於いては、請求項1記載の発明の作用のほか、カラム精製法の2番目に於いて、DEAEセファロースCL-6Bカラムを使用し、緩衝液として、3M(モル)尿素を含む30mMトリス緩衝液(pH7.5)500mlで平衡化して、カラム精製方法の前処理後の蛋白質を供給し、前記と同じ緩衝液にNaClを0乃至200mM加えた緩衝液をNaClの含有濃度を連続的に次第に高めながら温度の低い方から順に供給するから、蛋白質に結合もしくは取り込まれている不純物が尿素と結合して、除去される作用をなす。またこの段階の直後において、溶出液を透析することによって、前記尿素は溶出液から除去されて、単離した粗白質を変化させたり、活性を弱める作用は殆ど起させない作用をなす。

【0018】請求項3記載の発明においては、前記請求項1及び2記載の発明の作用のほか、前述の第1段階乃至第5段階によって、BCG菌を短期培養した使用済みの培養液より、目的とする蛋白質を純度高く少なくとも一種類、単離する作用をなす。殊に第2段階に於いて、単離すべき蛋白質が2種以上あるときは、複数の分画をそれぞれ独立に選択し、その後の段階に於いては各分画毎に独立しての精製が可能となる作用をなす。請求項4記載の発明においては、前記請求項3記載の作用のほか、目的蛋白質としてMPB64を純度高く単離する作用をなす。

【0019】請求項5記載の発明においては、前記請求項3記載の作用のほか、目的蛋白質として、MPB59、MPB64、MPB70、MPB80、及びMPB85の内の少なくとも2種を第2段階に於いて、それぞれ独立して同時に分離され、その後それぞれの分離された蛋白質に同時に平行して、それぞれ純度を高く単離する作用をなす。

【0020】請求項6記載の発明においては、前記請求項4で単離したMPB59、MPB64、MPB70、

(5)

8

7

MPB80、及びMPB85のうちの一種をその奥乃至  
凍結乾燥してあることを特徴とする遅延型過敏反応測定  
用試薬であるから、これらの抗体に対して、特異的反応  
をする作用をなす。

【0021】請求項7記載の発明においては、前記日本  
項4で単離したMPB59、MPB64、MPB70、  
MPB80、及びMPB85のうちの一種と軟膏剤とが  
混練してあることを特徴とする軟膏状の選択性過敏反応  
測定用試薬であるから、この一部を人間、牛などの動物  
の皮膚に塗布することによって、これらの皮膚に長時間  
付着でき、これら人間又は動物の前記特定蛋白質に対する  
抗体の有無により、これらの皮膚に発生する炎症乃至  
発赤を起こし、或いは起こさない作用をなす。

【002】請求項8記載の発明においては、之を皮膚に貼付することが可能となり、前記の請求項7記載の発明と同様の反応を皮膚に起こさせたり起こさない作用を為す。

[0023]

### 【発明の実施の形態】

## 材料と方法

材料二

### 培養液 ソートン (Sauton) 合成培養液

ソートン (Sauton) 培地を用いて、  
使用菌：日本のBCGワクチン製造の種株たるマイコバ  
クテリュウム・ボビスBCG東京 (*Mycobacterium bov*  
*is BCG Tokyo*、以下単にBCG菌と云う)。前記BCG  
菌を、前記ソートン培地に移植し、通気しないで3  
7°Cで表面培養した。8日目に培養した菌体をワクチン  
製造用として汎過により、集菌した後の使用済み培養液  
を捨て、出芽物質とした。

カラム: DEAEセファロースCL-6B, セファクリルS200HR, セファロースCL-4B (スエーデン製) を用いた。

【0024】サンブル濾膜：ミリポア・ペリコン・カセット・システム (Millipore Pellicon System) XX 42 PEL 60 (米国、MA州、ベッドフォード、ミリポア社製) とアミコン (Amicon) YM-3メンブレン (membrane) (米国、MA州、アミコン Inc. 製) を用いた。

【0025】2次元電気泳動(以下単に2D-Eと云う): 2D-Eとしてはミリポア・インベスティゲーター(Milliporeinvestigator)2-D電気泳動システムを用いた。1次元目は5.5%堿基・酸基両性(アンフォライト)混合物を含む9.5M尿素を用い、13乃至10の範囲、18000V/hrで等電点電気泳動を行った。2次元目は、12.5%ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel)を用い、16000mWでソディウム・ドデシル・サルファート-ポリアクリルアミドゲル(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel)電気泳動(以下単にSDS-PAGEと云う)を行った。

## 【0026】試験：ミリポア社製の2-D

テム用のものを使用した。ゲルは東京染色試験(日本、東京、第一化学製品株式会社製)で染色した。分子量の測定は標準蛋白質(米国、CA州、リッチモンド、バイオラッド・ラボラトリ一製)を用いた。その他の試薬として、特に注意書きのない全ての試薬は和光純薬株式会社製のものを用いた。

### 【0027】実施の形態1

次ぎに請求項1乃至請求項5記載の方法発明を含む実用新案の形態を説明する。

## 第1阶段（前处理）

先ず、前記出発物質たる使用済み培養液を80ml至100mlリッターを40°C至45°Cに温めて、No.2の沪紙（日本、東京、東洋沪紙株式会社製）で沪過し、前記出発物質中に残存するBCG菌体を沪別し、残いて40°C乃至45°C状態のまま、ミリポア・ペリコン・カセット装置に供給する。このミリポア・ペリコン・カセットPLCC00005の装置の二つのフィルターはグリセリンや他の培地成分のような分子量5000以下の小さい分子を除くために用いる。このようにして、最初の出発物質を300乃至400mlに濃縮する。この濃縮は時間を節約するために数区分に分け複数箇所の前記ミリポア・ペリコン・カセットPLCC00005を用いて行う場合もある。

【0028】前述の出発物質たる使用済み培養液は前述の通りの温度の底屈に加温されることにより、粘稠度が低下し、5000以下の分子量の小さい分子のフィルターを通過するのを容易にし、通過時間を短縮するのに役立つ。濾液は更にミリポア・メンブレン・ミリバッック60(0.22μmミリポアC○.、製)で再び通過し、ついでにDCC残体を除去する。

30 し、完全にBCG菌体を除去する。  
【0029】濃縮した培養沪液に硫酸アンモニウムを60%飽和に加え、全蛋白質を沈殿させた。この沈殿物混和液をそのまま、若しくは冷蔵庫で冷却保存した後、6000 rpmで遠心分離法により分離し、上清を除去する。この濃縮物の2D-E（2次元電気泳動）を図1に示す。BCG菌が分泌する蛋白質は等電点、及び分子量により多くの独立したスポットとして散らばっている。例えばMPB64 (26 kDa) を矢印で示す。

【0031】而して、滲出液を10mlづつ分画する。各分画液より、10μlづつサンプルを採取し、これと5倍稀釈したバイオラッド (Bio-Rad) 試薬 (Pr

( 6 )

9

otein Assay Bio-Rad) 50  $\mu$ lを混合し、マイクロア  
レートリーザーで600 nmの吸光度を測定する。その  
溶出パターンの例を図2に示す。図2において、例えば  
MPB 64のピークはMPBが含まれる最も大きな蛋白  
のピークの後に現れると、既に発表されているので、M  
PB 64を精製する場合、MPB 64が含まれる分画の  
検定は、溶出パターン及びSDS-PAGEを用いた分  
子量によるMPB 64の検出を行い、これらが含まれて  
いる分画を選択する。第2段階においては、一つ以上の  
分画にわたり、目的の蛋白質があるときは、これら複数  
の分画を選択する。

面の分画を選択する。

【0032】 SDS-PAGEの具体的な方法としては、グラシエントゲルとして10乃至20%ポリアクリルアミドゲルでマルチゲル・キット（日本、東京、日本第一製薬株式会社製、）を用い40mAで、標準の蛋白質例えばMPB64、MPB70と一緒に銀染色試薬で蛋白質を染色して、標準の蛋白質と対応した蛋白質を含む分画を選択する。目的の蛋白質例えばMPB64を含む分画をアミコンYS-3メンブレンを通して濃縮する。

【0033】濃縮物はスライド-A-ライザー・カセット（米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアス製、）に入れ、pH7.5の10mMトリスHCl緩衝液で4℃で一昼夜透析する。透析した原料はミリポア・ミレックスGVフィルター（0.22μm）を通し、蛋白量はペーパーリー法により定量した。

〔0034〕第3段階(尿素を含むDEAE-セファロ  
ースカラムによる精製)

DEAEセファロースCL-6Bカラム(直径10mm、容積75ml)を用い、これを3M尿素を含む30mMトリス-HCl緩衝液(pH7.5)500mlで平衡化した。第2段階からの濃縮物を前記DEAEセファロースCL-6Bカラムに供給し、前記平衡化に用いたと同じ成分の緩衝液に濃度勾配をもったNaCl(0乃至200mM)を加えて溶出する。

〔0035〕4℃で1分間に0.5mlの溶出速度として、溶出液をそれぞれ5mlの分画を46乃至100分画する。この各分画を第2段階と同様の方法により、ハイオラット試薬を用い600nmの吸光度を測定する。その結果は図4に示す通りである。また分画のサンプルは第2段階と同様SDS-PAGEで目的の蛋白質例えばMPB64を検出し、これに対応する分画を選択し、第2段階と同様に濃縮、透析、及び沪過を行い、目的の濃縮物を得る。前述の透析の過程において、溶出時に添加した尿素成分は除去される。蛋白量も前記第3段階と同様の方法により定量する。

【0036】第4段階（セファクリルカラムによる精製）  
セファクリルS200HRカラム（直徑25mm、容積450ml）を低温で10%エチレングリコール及び0.3MNaClを含む500mlの10mMトリス-

10  
HC1緩衝液(pH7.5)で平衡化する。第3段階で  
得た沈殿物を前記セファクリルS200HRカラムに供  
給し、前記平衡化に用いた同じ緩衝液で1分間に0.5  
mlの溶出速度で溶出し、順次分画容器に5mlずつ4  
6乃至100に分画し、各分画からのサンプルを第2段  
階のバイオラッド試薬の代わりにBCA蛋白分析試薬  
(米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアス社製)を  
用い、第3段階と同様の方法により、562nmの吸光  
度測定とSDS-PAGEでによって、目的の蛋白質を  
検出し、化粧に検出する分画を選択する(図4参照)。

【0037】このときのゲルの染色はCBBで染色した後、より感度の高い銀染色することが好ましい。目的の蛋白質を含む分画を集め、アミコンYM-3メンブレンで濃縮し、4°Cで10 mMトリス-HCl緩衝液 (pH 8.7) 中で一昼夜透析する。更にこれを0.45 μmのミリポアフィルターで沪過する。回収した蛋白量はローリー法で評価する。

【0038】第5段階（尿素を含まないDEAE-セフ  
トロニスカラムによる精製）

アロースカラムに亘る。精製の最終段階に於いては、尿素を含まない50 mMのNaClを含む30 mMトリス-HC1緩衝液(pH 8.7)で平衡化したDEAEセファロースCL-6Bカラムに、段階4によって回収した蛋白質を供給し、4°Cで50乃至100 mMの濃度勾配のNaClを含む500 mlの30 mMトリス-HC1緩衝液で、1分間に0.5 mlの落出速度で落出し、順次5 mlずつ分46乃至100に画する(図5参照)。

【0039】目的の蛋白質の検出は第3段階と同様の方法で600nmの吸光度及びSDS-PAGEで行う。前段階同様に目的の蛋白質を含む分画を集め、濃縮し、10mMトリス-HCl緩衝液(pH8.7)中で透析し、ミリポアミレックス-GVフィルター(0.22μmミリポアCo.)で通過する。最終回収蛋白量はローリー法で測定する。

【0040】前述の実施の形態においては、主として、MPB64及びMPB70の単離に就いて説明したが、他の有用な蛋白質を同時に単離する方法も前記請求項1乃至請求項5の発明に含まれる。これら複数の蛋白質を単離する場合は、第2段階で複数の蛋白質をそれぞれに分離した後の単離は各蛋白質毎に並行して、行なうことは勿論である。つまり、複数の蛋白質を同時並行的に精製することになる。

【0041】前記の第3段階及び第5段階において、溶出に使用する緩衝液の添加物の温度は濃度勾配のあるものを説明したが4乃至10段階に分けた段階的な添加物の濃度差のものを順次供給する方法もこの実施の形態に含まれる。

【0042】実施の形態2  
請求項6記載の物の発明の実施の形態であり、前記の実施の形態1により精製されたMPB59、MPB64、

特種平9-206092

(7)

11

MPB70、MPB80及びMPB85のうちの一種を  
そのまま瓶又はアンプルに不活性ガスと共に密封し製品  
とする。

### 〔0043〕実施の形態3

請求項7記載の物の発明の実施の形態であり、実施の形態1により精製されたMPB 59、MPB 64、MPB 70、MPB 80及びMPB 85のうちの一種1.5mgに対し、リン酸緩衝液2mlに溶解し、これに親水性軟膏0.5g乃至1.5g及びトラガカントゴム粉末少量(0.02乃至0.05g)とを混合し、内径8mm乃至11mmの扁平容器に密封したもの。前記の各成分、重量及び容量は一例であって限定的な意味はない。

10044) 実情の形態4

請求項8記載の物の発明の実施の形態であり、実施の形態1により精製されたMPB59、MPB64、MPB70、MPB80及びMPB85のうちの一種に、リン酸緩衝液2m1に溶解し、グリセリン1m1、及び/又はポリエチレングリコール10%に混合し、皮膚に貼付してアレルギー反応をテストするパッチテスト (Patch-test) 用試験膏又はアルミニウム皿の中に戸紙を入れてある前記アルミニウム皿の中に、前記蛋白質よりなる抗原をたらし、この抗原を含浸した前記戸紙を皮膚に貼付して使用する所謂ファインチャンバーに5乃至20μ1含浸させたものを、プラスチック容器又は気密性袋に密封したもの

(0045)

【発明の効果】請求項1記載の発明においては、B・G・G  
菌培養後の使用培養液の利用であるから、産業廃棄物の  
有効利用であり、前記使用済み培養液を40°乃至45°  
に加温することによって、この培養液の粘稠が著しく  
低下するため、沪紙を通り易くなり、処理時間が短くな  
り、殊に使用済培養液に含まれる粘稠度の高いグリセー  
ルが除去され、以後の取扱が容易になる。またこの程度  
の加温では蛋白質の力価の劣化を来さない。

【0046】請求項2記載の発明においては、DEAEセファロースCL-6Bカラムを使用し、緩衝液として3M(モル)尿素を含む30mMトリス緩衝液(pH7.5)で平衡化した後、両様の尿素を含む緩衝液にNaClを0から200mMまで濃度を次第に高めながら、濃度の低い方から順に供給して、目的の蛋白質を溶出することによって、蛋白質に結合若しくは取り囲まれている不純物が除去され、また、溶出中において、溶出液の中性を保持し、かつその直後の透析及び沪別により、前記尿素は精製蛋白質から除去され、蛋白質に尿素による非可逆的な変性をもたらす影響を最小限に抑制する。

【0047】請求項3記載の方法においては、前記請求項1及び請求項2記載の発明の効果の外、第2段階の方 法を採用することにより、有用な蛋白質を一種又は二種 以上の蛋白質に分離することができる。更に、第3段階

以降の方法により、それぞれの蛋白質の純度を向上させる効果を有する。それぞれ単離された蛋白質は標準の蛋白質と比較して、同一のものと同定され、純度も標準のものと同程度のものがそれぞれ得られる。

【0048】その他、前記に例示していないが、前記の使用済み涙液に含まれる他の防禦抗原物質、ツベルクリン(tuberculin)、またミコバクテリア(mycobacteria)の共通抗原などを含む他のミコバクテリア抗原の精製にも適用し得る。

【0049】請求項4項記載の発明においては、請求項1乃至請求項3の効果の外単離する蛋白質がMPB64であるから、単離されたMPB64は、他のMPB70と組み合わせて、結核の感染及びBCG陽性を区別して判断し得ることができる。

【0050】請求項5記載の発明においては、請求項1乃至請求項4記載の効果の外単離する蛋白質がMPB5、MPB64、MPB70、MPB80及びMPB85のうちの2種以上の蛋白質を第2段階乃至第5段階の方法により同時帯に並行して行なう方法であるから、20 単一の出発物質から有効に2種以上の蛋白質を効率よくそれより単離できる効果を有する。

く、それでは本題として  
【0051】請求項6記載の発明においては、前述の通りの構成であるからMPB59、MPB64、MPB70、MPB80及びMPB85がそれぞれ単味で密封されたものであるから従来のツベルクリン反応試験と同様に適宜の稀釈剤で稀釈して、人間及び動物の皮膚に塗布又は皮内注射などに使用できる。また適宜の親水性軟膏剤、グリセリン、ポリエチレングリコールなどと混練して、軟膏として皮膚に塗布して反応試験として使用することも容易にできる。請求項7記載の発明においては、請求項6記載の発明の効果の外観に軟膏となっているから取扱いが容易で、皮膚に長時間接着させ易い。請求項8記載の発明においては、請求項8記載の効果の外観に8記載の発明になっているから、そのまま皮膚に貼付できる。詳細になっているから、そのまま皮膚に貼付できる。

【0052】実験例1  
実施の形態1の方法により、8日間BCG菌を培養した直後の培養液100リッターを用い、MPB64を単離した場合最終の第5段階において、単離したMPB64を5mg得た。而して、得られたMPB64及びMPB70をSDS-PAGEを行い、抗MPB64及び抗MPB70抗体を用いたイムノプロッティング法で試験したところ、それぞれ標準MPB64及MPB70と同じ反応を示した。

【0053】実験例2  
また、実施の態様1によりMPB 64及びMPB 70と  
をそれぞれ単離し、この二種の蛋白質を組み合わせて、  
それぞれ結核菌に感染させたモルモット及びBCG菌を  
接種したモルモットを用意して実験したところ、BCG  
接種によりツベルクリン陽転したモルモットはMPB 6  
4及びMPB 70に対して陽性の反応を示し、結核菌に

特開平9-206092

(8)

13

感染したものはMPB 64に対しては陽性であるが、MPB 70に対しては陰性であった。以上の結果から結核感染かBCG陽性かが容易に判別できた。

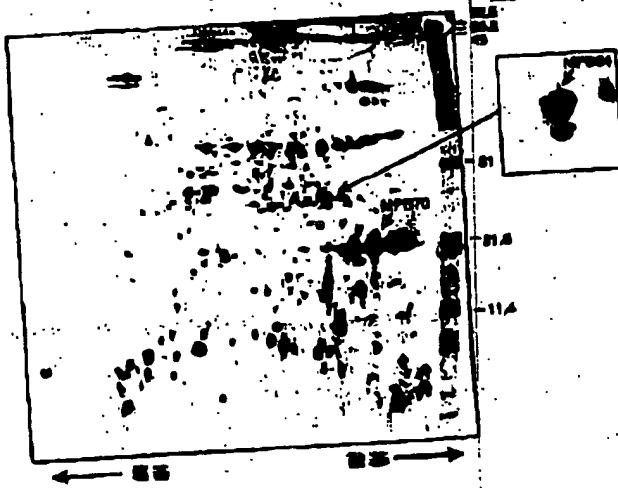
【0054】実験例3

MPB 59はツベルクリン反応と同様の効果があり、MPB 80及びMPB 85についてはこれを含む蛋白質に対し、アレルギーがあるか否かのテストに使用できた。この実験より人及び牛の結核感染の判断に有効に使用し得るものである。

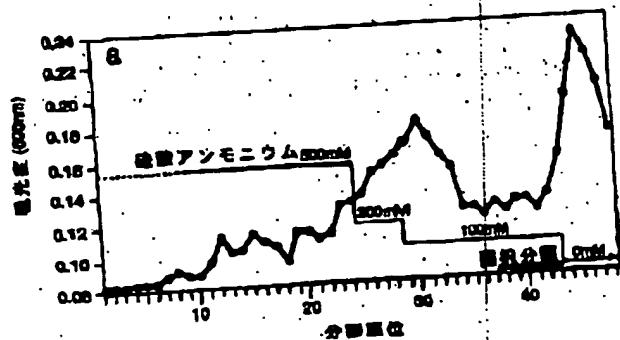
【図面の簡単な説明】

【図1】2D-E (2次元電気泳動)による各種蛋白質の等電点、分子量の分布図である。

【図1】



【図2】



14

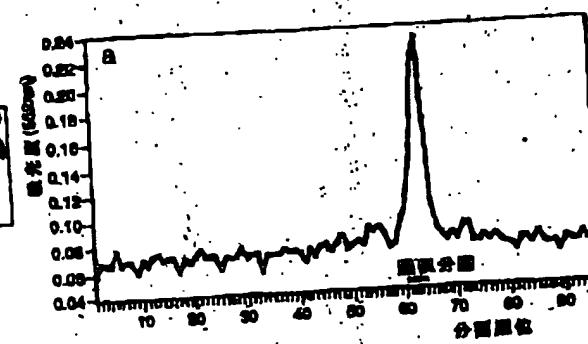
【図2】第2段階における各分画の蛋白量による吸光度分布及びSDS-PAGEにより決定された採取分画を示すグラフ。

【図3】第3段階における各分画の蛋白量による吸光度分布及びSDS-PAGEにより決定された採取分画を示すグラフ。

【図4】第4段階における各分画の蛋白量による吸光度分布及びSDS-PAGEにより決定された採取分画を示すグラフ。

【図5】第5段階における各分画の蛋白量による吸光度分布及びSDS-PAGEにより決定された採取分画を示すグラフ。

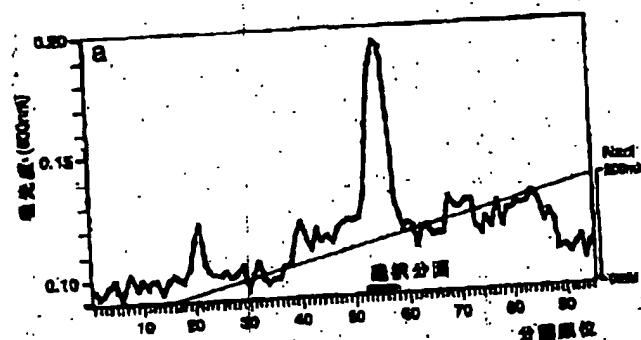
【図4】



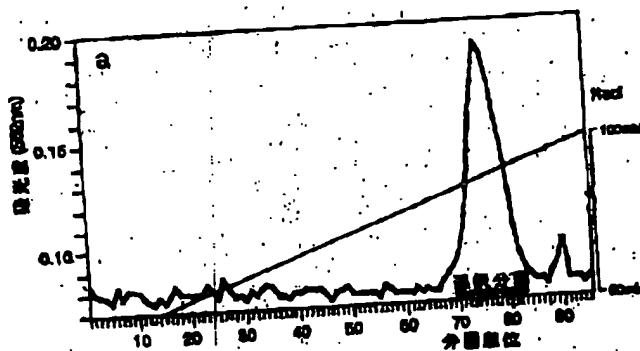
特開平9-206092

(9)

【図3】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

//(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:32)

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

(72) 発明者 万賀 伸治  
神奈川県川崎市高津区梶ヶ谷3丁目8番40  
号

(72) 発明者 永井 定  
大阪府豊中市上野西4丁目5番54号